

基因及其蛋白在肿瘤中的表达

DOI: 10.11699/cyxb20130811

沉默 NFBD1 表达对鼻咽癌细胞凋亡的影响

刘学良, 曾 泉, 邱志利, 胡国华

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究抑制 NFBD1 表达后,对鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)细胞株 HNE-1 凋亡的影响。**方法:**用 NFBD1 shRNA 慢病毒感染 HNE-1,采用 real-time PCR 和 Western blot 检测 NFBD1 shRNA 慢病毒对 NFBD1 的抑制效果;Hoechst33342 染色观察细胞核的改变并结合流式细胞仪(flow cytometry,FCM),TUNEL 法检测细胞的凋亡情况。**结果:**NFBD1 shRNA 慢病毒在 mRNA 和蛋白质水平均能高效、特异地抑制 NFBD1 的表达;Hoechst33342 染色结果显示,在 NFBD1 下调组,呈现固缩且边缘化的细胞核数量明显增加($\chi^2=5.367$; $P=0.021$);TUNEL 染色结果显示,在 NFBD1 下调组,显现荧光的凋亡细胞明显增加,FCM 检测结果显示,在 NFBD1 下调组,细胞凋亡率明显增加($\chi^2=326.86$; $P<0.001$)。**结论:**抑制 NFBD1 基因的表达后,能有效促进 HNE-1 凋亡,这为寻求 NPC 的治疗靶点提供新的思路。

【关键词】NFBD1;鼻咽癌;凋亡**【中国图书分类法分类号】**R739.63**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-11-03

Effects of NFBD1 gene silencing on apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells

LIU Xueliang, ZENG Quan, QIU Zhili, HU Guohua

(Department of Otorhinolaryngology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of nuclear factor with BRCT domains protein 1 (NFBD1) gene silencing on apoptosis in nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. **Methods:** Retroviruses expressing NFBD1 shRNA were applied to infect NPC cell line HNE-1. Real-time PCR and Western blot were used to confirm the inhibitory effects of retroviruses against NFBD1. Flow cytometry (FCM), TUNEL and Hoechst33342 staining methods were used to tested cell apoptosis. **Results:** NFBD1 shRNA retrovirus can inhibit mRNA and protein expressions of NFBD1 efficiently and specifically. According to the results of Hoechst33342 staining, nucleus exhibiting pycnosis and marginalization were increased significantly in experimental group than in control group ($\chi^2=5.367$, $P=0.021$). According to the results of TUNEL staining, apoptotic cells presenting fluorescence were increased significantly in experimental group than in control group. According to the results of FCM, cell apoptosis was significantly increased in experimental group than in control group ($\chi^2=326.86$, $P<0.001$). **Conclusions:** NFBD1 gene silencing in nasopharyngeal carcinoma cell line HNE-1 can effectively promote the HNE-1 apoptosis, which provide new ideas for treatment of NPC.

【Key words】nuclear factor with BRCT domains protein 1; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是头颈部常见的恶性肿瘤,具有明显的种族聚集性和地域性。其严重危害了中国南方及东南亚地区人们的生命健康。NPC 的发生是一个多阶段、多途径、多机制的过程,涉及许多重要基因参与。

NFBD1 也称 DNA 损伤关卡蛋白 1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1, MDC1), 是一个参与 DNA 损伤细胞应答通路的重要分子。NFBD1 基因在超长 cDNA 文库大规模测序时被发现, 编号为 KIAA0170, cDNA 长度为 6 940 bp^[1]。该基因定位于 6p21.23, 由 14 个外显子和 13 个内含子组成。NFBD1 蛋白由 2 089 个氨基酸组成, 分子量为 227 kD, 包含 1 个位于 N 端的 FHA 结构域、2 个位于 C 端的 BRCT 结构域和中间的多个重复 P/ST 结构域^[2]。研究证实^[3-5], NFBD1 在 DNA 损伤检测点信号转导途

作者介绍: 刘学良, Email: liuxueliang0829@163.com,

研究方向: 头颈肿瘤的基础与临床。

通信作者: 胡国华, Email: hghcq@sina.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金重点资助项目(编号: cstc2012jjB10015);

重庆市卫生局资助项目(编号: cstc2010220)。

径中起着重要的作用并直接参与 DNA 损伤后的修复。近年来研究发现,NFBD1 与细胞凋亡密切相关。Xu 和 Stern^[6]的研究结果表明:NFBD1 表达抑制后,能促进细胞凋亡。另外,Nakanishi 等^[7]发现:DNA 损伤后 NFBD1 通过与 p53 相互作用而调节细胞凋亡。但关于 NFBD1 与 NPC 细胞凋亡关系的研究还未见报道。本实验通过采用 NFBD1 shRNA 慢病毒抑制 NFBD1 的表达,观察 HNE-1 细胞凋亡变化,这对于进一步探讨 NFBD1 在 NPC 细胞凋亡中的作用及其作为分子靶点用于肿瘤治疗的潜在价值具有积极的意义。

1 对象和方法

1.1 对象

细胞株人 NPC 细胞系 HNE-1 购自中南大学湘雅中心实验室,采用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养,置于 5%CO₂、37 °C 培养箱中培养。

1.2 主要试剂

RPMI1640 培养基及胎牛血清购于赛默飞世尔生物化学制品公司,NFBD1 shRNA 慢病毒购自上海吉凯公司。嘌呤霉素购自上海生工公司。RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、real-time PCR 试剂购自 TAKARA 公司。Hoechst33342 染色试剂盒和 TUNEL 试剂盒,均购于碧云天生物技术研究所。

1.3 方法

1.3.1 慢病毒感染 HNE-1 按 2.5×10⁴ 个/孔接种于 6 孔板中,当细胞融合度约为 10%时,分别用 NFBD1 shRNA 慢病毒、阴性对照慢病毒感染细胞(同时设立未感染孔,以便药物筛选)。病毒感染 48 h 后,加入浓度为 0.6 μg/ml 嘌呤霉素进行筛选。3 d 后,未感染孔的细胞全部死亡。

1.3.2 NFBD1 表达检测

1.3.2.1 NFBD1 基因 mRNA 表达水平检测 参照 RNAiso Plus 说明书提取细胞总 RNA,检测 RNA 的浓度和纯度,逆转录合成 cDNA,稀释 20 倍,采用荧光定量 PCR 对其进行扩增。反应条件为:94 °C 变性 4 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,共 30 个循环;后 72 °C 延伸 10 min。NFBD1 引物和 β-actin 引物均由大连 TAKARA 公司合成。β-actin 和 NFBD1 的上下游引物序列见表 1。实验独立地重复 3 次,每次实验包含 1 个对照组和 1 个实验组,每组设置 3 个重复。

1.3.2.2 NFBD1 蛋白水平表达的检测 采用 Western blot 法。用预冷的 PBS 溶液洗涤细胞 3 次,用 Western blot 裂解液(碧云天);PMSF 溶液(碧云天)(100:1 比例)混合液 4 °C 裂解细胞 20 min,4 °C,12 000 g 离心 10 min,取上清液,采用 BCA 法(北京中杉金桥)测定蛋白浓度,蛋白量调整一致后,取样,经电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h;加入 anti-NFBD1(1:800)一抗和 anti-β-actin(1:1 000)一抗,4 °C 过夜;TBST 洗涤 8 min×5 次,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠或兔 IgG(1:500)(Biorworld 公司),室温下反应 1 h;TBST 洗涤 8 min×5 次,化学发光法显影。实验独立地重复 3 次,每次实验包含 1 个对照组和 1 个实验组,每组设置 3 个重复。

1.3.3 采用 Hoechst33342 染色法观察细胞核的改变 将稳定表达 NFBD1 shRNA 的细胞(实验组细胞)和对照组细胞按 10%的融合度分别接种于 24 孔板中爬片,培养 72 h 后,PBS 洗涤 1 次,以后步骤按照试剂盒说明书进行,显微镜下观察照相。实验独立地重复 3 次。

1.3.4 采用 TUNEL 法检测 HNE-1 细胞凋亡 将稳定表达 NFBD1 shRNA 的细胞(实验组细胞)和对照组细胞按 10%的融合度分别接种于 24 孔板中爬片,培养 72 h 后,PBS 洗涤 1 次,以后步骤按照试剂盒说明书进行,在荧光显微镜下观察照相。实验独立地重复 3 次。

1.3.5 采用流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测细胞凋亡率 将稳定表达 NFBD1 shRNA 的细胞(实验组细胞)和对照组细胞按 10%的融合度分别接种于 6 孔板中,培养 72 h 后,用预冷 PBS 洗涤 2 次,用胰酶消化后将细胞收集到离心管中,用 PBS 洗涤 2 次,送至重庆医科大学生命科学院代检。实验独立地重复 3 次。

1.4 统计学处理

定量资料采用均数±标准差表示。数据采用 SPSS 16.0 统计学软件处理。定量资料用配对 *t* 检验分析 3 次独立实验的实验数据,定性资料用卡方检验分析。当 *P*≤0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NFBD1 shRNA 慢病毒对 NFBD1 mRNA 水平和蛋白水平的抑制效果

Real-time PCR 结果显示,实验组 NFBD1 mRNA 的表达水平为(34.49±9.73)%,明显低于对照组的 100%(*t*=11.668;

表 1 荧光定量 PCR 试验所用的引物序列
Tab.1 Primer sequences for real-time PCR

基因名称	上游引物	下游引物
β-actin(205 kb)	5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'	5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'
NFBD1(256 kb)	5'-AGCAACCCCACTGTTCATTC-3'	5'-TCAGATGTCCCAAAGTCAGC-3'

$P=0.007$), 见图 1。

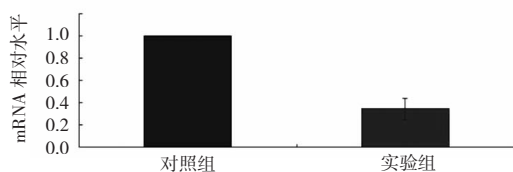


图 1 各组细胞中 NFBD1 基因 mRNA 的表达水平

Fig.1 mRNA expressions of NFBD1 in two groups detected by real-time PCR

Western blot 结果显示,实验组 NFBD1 蛋白的表达水平为 $(35.50 \pm 1.59)\%$, 明显低于对照组的 $(90.87 \pm 3.10)\%$ ($t=40.991$; $P=0.001$), 见图 2。

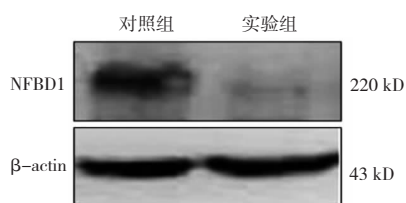
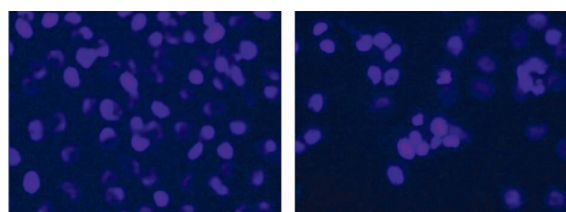


图 2 两组细胞中 NFBD1 蛋白的表达水平

Fig.2 Protein expressions of NFBD1 in two groups detected by Western blot

2.2 Hoechst33342 荧光染色法检测抑制 NFBD1 表达对 NPC 细胞凋亡的影响

Hoechst33342 荧光染色结果见图 3, 实验组中亮蓝色的凋亡细胞明显多于对照组。提示抑制 NFBD1 的表达可以促进 NPC 细胞 HNE-1 的凋亡。Hoechst33342 是一种能够穿透细胞膜的蓝色荧光染料。在荧光显微镜下观察, 凋亡细胞的细胞核固缩呈致密浓染或呈块状或颗粒状致密浓染(亮蓝色), 而未发生凋亡的细胞只是被淡染(淡蓝色)。荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。取 3 个高倍镜视野, 分别计算细胞总数和凋亡细胞数, 凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ ($\chi^2=5.367$; $P=0.021$)。



A. 对照组 B. 实验组

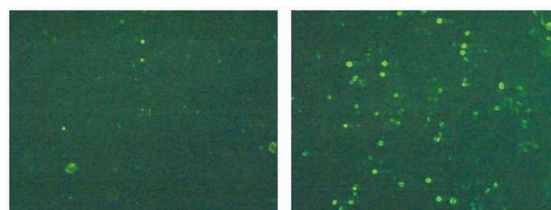
图 3 Hoechst33342 荧光染色实验 (200 $\times$)

Fig.3 Fluorescent staining of Hoechst33342 (200 $\times$)

2.3 TUNEL 荧光染色法检测抑制 NFBD1 表达对 NPC 细胞凋亡的影响

TUNEL 荧光染色结果见图 4, 实验组中呈绿色荧光的凋亡细胞明显多于对照组。再次证明抑制 NFBD1 的表达可以促进 NPC 细胞 HNE-1 的凋亡。细胞经 TUNEL 荧光染色后,

在荧光显微镜下观察, 凋亡细胞会发出绿色荧光, 而未发生凋亡的细胞不会带荧光。



A. 对照组

B. 实验组

图 4 TUNEL 荧光染色实验 (100 $\times$)

Fig.4 TUNEL fluorescent staining (100 $\times$)

2.4 FCM AnnexinV/PI 双染色法检测细胞凋亡率

FCM 检测结果见图 5, 实验组细胞早期凋亡率为 12.44%, 明显高于对照组的 4.47% ($\chi^2=326.86$; $P<0.001$)。进一步提示抑制 NFBD1 的表达可以促进 NPC 细胞 HNE-1 的凋亡。

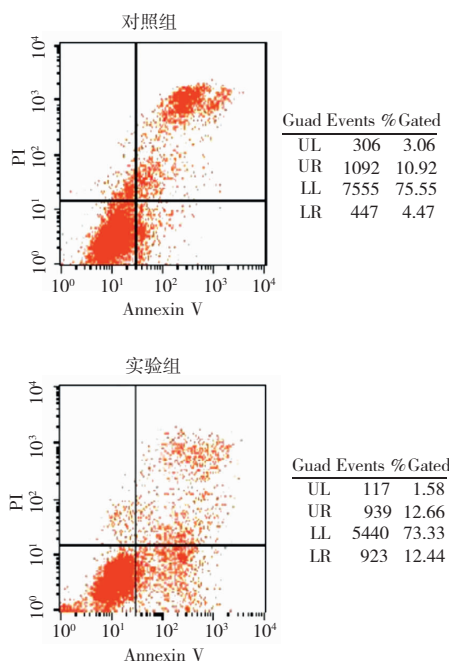


图 5 FCM AnnexinV/PI 双染色法检测细胞凋亡

Fig.5 Cell apoptosis detected by FCM with AnnexinV/PI double staining

3 讨论

DNA 损伤应答反应在肿瘤发生发展中起着重要的作用, 这是因为 DNA 损伤应答反应能够维持基因组的稳定性, 防止基因发生突变从而避免肿瘤的发生, 例如 P53 和 BRCA1 都是经典的参与 DNA 损伤应答反应的抑癌基因^[8-9]。NFBD1 作为 DNA 损伤应答系统的一个新成员, 其相关功能研究正成为国内外学者关注的热点。目前研究发现: 在 DNA 损伤后 NFBD1 发生磷酸化, 并和 DNA 损伤应答通路

中的多个蛋白相互作用,从而介导 DNA 损伤修复或者促进细胞发生凋亡^[10]。具体的机制可以概括为:在 DNA 损伤初期,NFBD1 表达增加,与 P53 结合,抑制 P53 磷酸化,从而抑制 P53 促凋亡的作用并同时启动 NFBD1 介导的 DNA 修复机制,细胞 DNA 得以修复从而使细胞尽量存活下来。如果损伤难以修复,NFBD1 表达就会下降,P53 与 NFBD1 分离,从而发挥 P53 促凋亡的作用。所以 NFBD1 是 P53 介导的与凋亡密切相关的重要分子^[11-12]。以上研究结果提示,抑制 NFBD1 的表达可以导致 DNA 损伤在细胞内的大量堆积而引起细胞凋亡。Bu 等^[13]研究发现:下调 NFBD1 可以引起 HELA 细胞凋亡和周期在 G2/M 发生阻滞。Xu 和 Stern^[6]通过 TUNEL 染色观察到抑制 NFBD1 的表达后,能够促进细胞发生凋亡。另一个研究小组最近发现:NFBD1 与 caspase-3 相互作用从而参与细胞的凋亡应答^[14]。众所周知治疗恶性肿瘤常用的放,化疗手段是利用其损伤肿瘤细胞的 DNA 从而达到杀灭肿瘤细胞的目的,因此从理论上讲下调肿瘤细胞中 NFBD1 的表达可增强细胞对放化疗的敏感性。Zhang 等^[4]发现:沉默 NFBD1 能够提高肿瘤细胞对电离辐射的敏感性。Yang 等^[15]研究发现:抑制 NFBD1 表达后可以提高食管癌细胞对顺铂和阿霉素的敏感性。以上这些结果提示:NFBD1 是一个很有应用前景的肿瘤治疗新靶点。

抑制 NFBD1 的表达既可以促进肿瘤细胞凋亡又可以提高肿瘤细胞对放化疗的敏感性,那么 NFBD1 在肿瘤细胞中可能是一个癌基因。但是国外的一个研究小组发现:NFBD1 在乳腺癌、肺癌中的表达与癌旁组织相比其表达降低甚至缺失,而在睾丸生殖细胞瘤组织中没有观察到类似现象,这提示在不同类型的肿瘤中,NFBD1 的作用可能不同^[16]。所以有必要明确 NFBD1 在不同组织中的确切作用。

本实验以 NPC 为研究对象,第 1 次较为系统的阐明了 NFBD1 与 NPC 细胞凋亡的关系。本实验结果表明,NFBD1 shRNA 慢病毒感染 NPC 细胞后,NFBD1 表达下调,能够促进 NPC 细胞发生凋亡。该实验结果提示:在 NPC 中 NFBD1 可能是个癌基因。

总之,本实验研究结果发现,NFBD1 下调能够促进 NPC 细胞 HNE-1 发生凋亡,表明其可能是 NPC 新的治疗靶点这为推动 NFBD1 在 NPC 中的系统研究具有积极的现实意义。

参 考 文 献

- [1] Nagase T, Seki N, Ishikawa K, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes V: the coding sequences of 40 new genes (KIAA0161-KIAA0200) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 [J]. *DNA Res*, 1996, 3(1): 17-24.
- [2] Ozaki T, Nagase T, Ichimiya S, et al. NFBD1/KIAA0170 is a novel nuclear transcriptional transactivator with BRCT domain [J]. *DNA Cell Biol*, 2000, 19(8): 475-485.
- [3] Goldberg M, Stucki M, Falck J, et al. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint [J]. *Nature*, 2003, 421(6926): 952-956.
- [4] Zhang J, Ma Z, Treszezamsky A, et al. MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(10): 902-909.
- [5] Stucki M, Clapperton J A, Mohammad D, et al. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks [J]. *Cell*, 2005, 123(7): 1213-1226.
- [6] Xu X, Stern D F. NFBD1/MDC1 regulates ionizing radiation-induced focus formation by DNA checkpoint signaling and repair factors [J]. *FASEB J*, 2003, 17(13): 1842-1848.
- [7] Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, et al. NFBD1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(31): 22993-23004.
- [8] Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 316-323.
- [9] Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis [J]. *Nature*, 2005, 434(7035): 864-870.
- [10] Miller J, Stagljar I. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 261: 247-262.
- [11] Nakanishi M. Regulation of p53 dependent apoptosis by functional binding of NFBD1/MDC1 [J]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 2006, 81(3): 221-226.
- [12] Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, et al. NFBD1/MDC1 associates with P53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(31): 22993-23004.
- [13] Bu Y, Suenaga Y, Okoshi R, et al. NFBD1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(2): 157-162.
- [14] Solier S, Pommier Y. MDC1 cleavage by caspase-3: a novel mechanism for inactivating the DNA damage response during apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3): 906-913.
- [15] Yang Z, Bu Y, Wang C, et al. Growth inhibition, morphology change, and cell alterations in NFBD1-depleted human esophageal cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342(1-2): 1-6.
- [16] Bartkova J, Horejsi Z, Sehested M, et al. DNA damage response mediators MDC1 and 53BP1: constitutive activation and aberrant loss in breast and lung cancer, but not in testicular germ cell tumours [J]. *Oncogene*, 2007, 26(53): 7414-7422.

(责任编辑: 关蕴良)